

**PCT** ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL  
Oficina Internacional  
**SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)**



|  |           |   |
|--|-----------|---|
| (51) Clasificación Internacional de Patentes <sup>6</sup> :<br><b>C12N 15/31, 1/21, A61K 39/106, C12N 9/10 // (C12N 1/21, C12R 1:63)</b> | <b>A2</b> | (11) Número de publicación internacional: <b>WO 99/35271</b><br>(43) Fecha de publicación internacional: 15 de Julio de 1999 (15.07.99) |
|--|-----------|---|

(21) Solicitud internacional: PCT/CU98/00008  
(22) Fecha de la presentación internacional: 30 de Diciembre de 1998 (30.12.98)

(30) Datos relativos a la prioridad: 142/97 30 de Diciembre de 1997 (30.12.97) CU

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS [CU/CU]; Avenida 25 #15202 esq. a 158, Cubanacán, Playa, Ciudad de la Habana 12100 (CU).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/solicitantes (sólo US): CAMPOS GOMEZ, Javier [CU/CU]; Villuendas No. 408 entre Sñdico y Caridad, Villa Clara, Santa Clara 50100 (CU). FANDO CALZADA, Rafael Alfredo [CU/CU]; Apartamento 41, Calle 43 No. 5838 entre 58B y 58C, Reparto Ceiba, Playa, Ciudad de la Habana 11400 (CU). RODRIGUEZ GONZALEZ, Boris Luis [CU/CU]; Apartamento 6K entre 31 y 33, Calle 186 No. 3117, Playa, Ciudad de la Habana 11500 (CU). LEDON PEREZ, Talena Yamile [CU/CU]; Calle Maloja No. 270 entre Lealtad y Campanario, Centro Habana, Ciudad de la Habana 12400 (CU). VALLE DIAZ,

Edgar [CU/CU]; Avenida Finlay No. 464 entre 1 y 3, Reparto Puerto Príncipe, Camaguey 70800 (CU). SILVA CABRERA, Anisia Juana [CU/CU]; Calle 208 No. 1935 entre 19 y 21, Atabey, Playa, Ciudad de la Habana 12100 (CU). BENITEZ ROBLES, Jorge Antonio [US/CU]; Calle 208 No. 1935 entre 19 y 21, Atabey, Playa, Ciudad de la Habana 12100 (CU).

(74) Mandatario: RUIZ SOTOLONGO, María Lourdes; Claim Consultores de Marcas y Patentes, Calle 14 No. 308 entre 3ra y 5ta Avenida, Miramar, Playa, Ciudad de la Habana 11300 (CU).

(81) Estados designados: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, Patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publicada**

Sin informe de búsqueda internacional. será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe.

(54) Title: **VIBRIO CHOLERAEE VACCINE CANDIDATES AND METHOD OF THEIR CONSTRUCTING**

(54) Título: **NUEVOS CANDIDATOS VACUNALES DE VIBRIO CHOLERAEE Y METODOS DE OBTENCION**

(57) Abstract

The present invention relates to new vaccine strains of *Vibrio cholerae* wherein the mucinase activity coded by the gene of the hemagglutinine protease has been eliminated. Said gene has been interrupted with the insertion of a marker gene. There is also disclosed another mutant of *Vibrio cholerae* having better properties of biosecurity.

(57) Resumen

En la presente invención se describen nuevas cepas vacunales de *Vibrio cholerae* en las cuales se ha eliminado la actividad mucinasa codificada por el gen de la hemaglutinina proteasa. Dicho gen ha sido interrumpido con la inserción de un gen marcador. Se describe otro mutante de *Vibrio cholerae* con mejores atributos de bioseguridad.

### UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

|    |                          |    |  |    |                                     |    |                           |
|----|--------------------------|----|--|----|-------------------------------------|----|---------------------------|
| AL | Albania                  | ES | España                                 | LS | Lesotho                             | SI | Eslovenia                 |
| AM | Armenia                  | FI | Finlandia                              | LT | Lituania                            | SK | Eslovaquia                |
| AT | Austria                  | FR | Francia                                | LU | Luxemburgo                          | SN | Senegal                   |
| AU | Australia                | GA | Gabón                                  | LV | Letonia                             | SZ | Swazilandia               |
| AZ | Azerbaiyán               | GB | Reino Unido                            | MC | Mónaco                              | TD | Chad                      |
| BA | Bosnia y Herzegovina     | GE | Georgia                                | MD | República de Moldova                | TG | Togo                      |
| BB | Barbados                 | GH | Ghana                                  | MG | Madagascar                          | TJ | Tayikistán                |
| BE | Bélgica                  | GN | Guinea                                 | MK | Ex República Yugoslava de Macedonia | TM | Turkmenistán              |
| BF | Burkina Faso             | GR | Grecia                                 | ML | Mali                                | TR | Turquía                   |
| BG | Bulgaria                 | HU | Hungría                                | MN | Mongolia                            | TT | Trinidad y Tabago         |
| BJ | Benin                    | IE | Irlanda                                | MR | Mauritania                          | UA | Ucrania                   |
| BR | Brasil                   | IL | Israel                                 | MW | Malawi                              | UG | Uganda                    |
| BY | Belarús                  | IS | Islandia                               | MX | México                              | US | Estados Unidos de América |
| CA | Canadá                   | IT | Italia                                 | NE | Niger                               | UZ | Uzbekistán                |
| CF | República Centroafricana | JP | Japón                                  | NL | Países Bajos                        | VN | Viet Nam                  |
| CG | Congo                    | KE | Kenya                                  | NO | Noruega                             | YU | Yugoslavia                |
| CH | Suiza                    | KG | Kirguistán                             | NZ | Nueva Zelandia                      | ZW | Zimbabwe                  |
| CI | Côte d'Ivoire            | KP | República Popular Democrática de Corea | PL | Polonia                             |    |                           |
| CM | Camerún                  | KR | República de Corea                     | PT | Portugal                            |    |                           |
| CN | China                    | KZ | Kazakstán                              | RO | Rumania                             |    |                           |
| CU | Cuba                     | LC | Santa Lucía                            | RU | Federación de Rusia                 |    |                           |
| CZ | República Checa          | LI | Liechtenstein                          | SD | Sudán                               |    |                           |
| DE | Alemania                 | LK | Sri Lanka                              | SE | Suecia                              |    |                           |
| DK | Dinamarca                | LR | Liberia                                | SG | Singapur                            |    |                           |
| EE | Estonia                  |    |  |    |                                     |    |                           |

## NUEVOS CANDIDATOS VACUNALES DE *VIBRIO CHOLERA*E Y METODOS DE OBTENCIÓN

### Sector técnico

5 El campo de esta invención es el de la biotecnología y más específicamente la obtención de vacunas contra el cólera y los procedimientos de ingeniería genética empleados para obtener dichas vacunas.

### Técnica anterior

10 Durante la descripción de la invención se utilizan algunos términos específicos de la temática cólera, cuyo significado relacionamos a continuación:

Entiéndase por virus  $ctx\Phi$  la partícula núcleo-proteica producida por el *Vibrio cholerae* que tiene la capacidad de transferir a otros vibrios el DNA contenido en su interior que comprende los genes de la toxina del cólera.

15 Entiéndase por toxina del cólera aquella proteína que cuando es producida por el microorganismo es el factor responsable de los síntomas clínicos de esta enfermedad.

Entiéndase por genes de las toxinas que acompañan el genoma del fago  $ctx\Phi$ , además de los genes de la toxina del cólera; el de la proteína ZOT, cuya actividad es responsable de la destrucción de las uniones estrechas entre las células del epitelio del intestino; y el de la proteína ACE, cuya actividad es accesoria a la de la toxina del cólera.

Entiéndase por cepas o vacunas no toxigénicas de *Vibrio cholerae* aquellas cepas desprovistas de los genes de las toxinas mencionadas, que pueden ser útiles como vacunas pero que por lo general manifiestan reactogenicidad residual.

25 Entiéndase por cepas o vacunas inocuas de *Vibrio cholerae* aquellas que mediante algún procedimiento han sido desprovistas del grueso de la reactogenicidad residual anteriormente mencionada.

Entiéndase por hemaglutinina proteasa (HAP), aquella proteína secretada por *Vibrio cholerae* que tiene actividad dual; manifestada una de ellas en su capacidad para aglutinar los eritrocitos de determinadas especies y la otra en su propiedad de degradar o procesar otras proteínas como la mucina y la toxina del cólera.

30

Entiéndase por *ce/A* aquella secuencia nucleotídica que codifica para la síntesis de la endoglucanasa A, proteína producida por cepas de *Clostridium thermocellum*, cuya característica esencial es su actividad  $\beta(1-4)$  glucan-glucano hidrolasa que le confiere capacidad para digerir la celulosa y sus derivados.

5 Entiéndase por timidilato sintasa aquella proteína que cataliza la metilación reductora del 5'-monofosfato de desoxiuracilo (dUMP) por el  $N^5-N^{10}$  metilentetrahidrofolato para producir 2'-desoxitimidina-5'-monofosfato (dTMP) y dihidrofolato.

10 El término DNA suficientemente puro se refiere al DNA que está libre de secuencias inmediatamente contiguas por los extremos 5' o 3' terminales del gen *thyA*, en la estructura natural del genoma del microorganismo al cual se refiere esta invención. El término secuencias derivadas incluye, por ejemplo, un DNA recombinante incorporado en una cepa vector, línea celular o plásmido, o existente como una molécula independiente (por ejemplo, cDNA, fragmento de restricción o de PCR).  
15 También incluye moléculas de DNA recombinante que formen parte de un gen híbrido codificador de secuencias adicionales.

El término secuencias homólogas se refiere a secuencias de DNA o proteínas que comparten residuos similares o idénticos, siendo nucleótidos o aminoácidos, respectivamente, en posiciones idénticas de dos o más cadenas dadas. A mayor  
20 número de residuos idénticos/similares mayor será el porcentaje de identidad/similitud entre las dos cadenas dadas.

El cólera es una enfermedad diarreica aguda causada por una infección oral con la bacteria *Vibrio cholerae*. Actualmente, después de 100 años de investigaciones  
25 sobre el cólera, todavía no existe una vacuna segura y eficaz contra la enfermedad. La humanidad ha sido testigo de siete pandemias, las primeras seis fueron causadas por cepas del biotipo clásico y la séptima está caracterizada por el predominio de cepas de biotipo El Tor. Recientemente, a principios de enero de 1991, la última pandemia se extendió hasta América del Sur, causando más de 25 000 casos y por encima de 2000  
30 muertes en Perú, Ecuador y Chile. En Noviembre de 1992, un nuevo serogrupo de *Vibrio cholerae* apareció en la India y Bangladesh, el O139, mostrando un gran potencial epidémico que generó una gran amenaza para los países del tercer mundo.

Los hechos anteriores refuerzan la necesidad de obtener una vacuna efectiva contra los serogrupos O1 (biotipo El Tor) y O139 de *Vibrio cholerae*.

Al terminar un episodio de cólera el ser humano permanece inmunizado contra su agente causal por un periodo mínimo de tres años. Basado en este conocimiento, se han hecho múltiples esfuerzos para atenuar el microorganismo y obtener una vacuna viva que al ser inoculada por vía oral asemeje el proceso infeccioso natural y produzca una sólida respuesta inmune sin causar reacciones adversas en los vacunados. Dichas vacunas contienen mutaciones del tipo de las deleciones en su cromosoma que desproveen al microorganismo de los genes tóxicos codificados en el genoma del profago CTX $\phi$ . Ver patentes de James B. Kaper, WO 91/18979 y John Mekalanos WO 9518633 de los años 1991 y 1995, respectivamente.

La primera vacuna contra el cólera fue una vacuna clásica (1885, 1892), consistente en la inyección de células completas "atenuadas", la cual resultó limitada en eficacia y muy reactogénica (Finkelstein R. A., International Symposium on Cholera on the America Continent. Sao Paulo, SP, Brasil, 1992). En 1892 se ensayó por primera vez la vacunación con una cepa viva "atenuada" de *Vibrio cholerae* administrada por vía oral, pero la interpretación inadecuada de los resultados no permitió comprender la efectividad de la vacunación oral con cepas vivas. Luego de volver a estudiar la vacunación oral e inyectada, con células muertas o inactivadas, en la década del 1970-80 se retomaron los estudios de vacunación oral con la bacteria viva en el centro de desarrollo de vacunas de Los Estados Unidos de América. Las primeras variantes utilizaron microorganismos obtenidos por técnicas de mutagénesis química y por tanto estaban muy poco definidos genéticamente, observándose reversión a la virulencia en aislados del microbio obtenidos de las heces fecales de los voluntarios inmunizados (Levine y cols., Infect and Imm, N°2, 1984; Finkelstein y cols, patente US 4,328,209). El auge de la ingeniería genética durante esos años permitió obtener microorganismos "atoxigénicos" con variaciones genéticas bien definidas e imposibilitados de revertir al estado virulento que fueron ensayados en la vacunación, y mostraron muy buena protección contra la enfermedad (Kaper J. B. y Levine M. Patentes US 06,472,276 y 581,406). Sin embargo, el principal obstáculo para el uso de dichos microorganismos "atoxigénicos" ha sido la inducción de reacciones adversas inaceptables durante la vacunación (Levine y cols., Infect. and Imm. Vol 56, N°1, 1988).

De acuerdo con los datos anteriores el principal problema a solucionar durante la obtención de una vacuna efectiva contra el cólera es su inocuidad. En la actualidad se ha enfatizado en la existencia de mecanismos de transferencia horizontal de la información genética en las bacterias y es necesario atender también a los atributos de bioseguridad de la vacuna relacionados con el impacto ambiental. Paralelamente debe cuidarse su estabilidad y su inmunogenicidad.

En la actualidad existe una vacuna oral contra el cólera que utiliza células muertas suplementadas con subunidad B de la toxina del cólera (Holmgren y cols., Current topics in Microbiology and Immunology, Vol. 146, 1989). Dicha vacuna es inocua y efectiva pero debido a su naturaleza muerta, requiere dos o más dosis para generar una respuesta inmune equivalente a la de una infección por cólera, lo que encarece mucho su preparación.

Existe y se comercializa una vacuna viva para inmunizar oralmente contra el cólera, la cepa CVD103-HgR, que ha sido licenciada recientemente. Es una vacuna efectiva, inocua y barata; sin embargo su pertenencia al biotipo clásico condiciona que su eficacia protectora frente al biotipo El Tor y el serotipo O139 de *Vibrio cholerae*, que circulan de forma predominante en la pandemia actual, sea baja. (Consultar patente USA, 5399494).

Otros candidatos vacunales vivos para inmunizar contra el cólera han sido descritos en la patente WO 95/18633. Estos mutantes han sido generados a partir de cepas de los biotipos y serotipos de *Vibrio cholerae* que circulan en la pandemia actual y cubren efectivamente todos los serotipos de microorganismos, incluyendo el O139. Estas cepas son inocuas, baratas de producir y preliminarmente eficaces, sin embargo no han sido suficientemente ensayadas como la CVD103-HgR. Adicionalmente son microorganismos prototróficos con capacidad para sobrevivir en el medio ambiente y son mutantes no mótils generados espontáneamente, aunque en esta invención se describe una metodología para obtener en lo adelante mutantes no mótils por supresión de naturaleza definida. La propiedad que hace a estos microorganismos inocuos es su naturaleza no mótil, que les impide llegar eficientemente a la superficie del enterocito e inducir las reacciones adversas que inducen sus parentales.

Robert y cols., Vaccine, vol 14 N°16, 1517-22, 1996, demostraron que es factible insertar un gen marcador en el gen de la hemaglutinina proteasa (*hap*) de *Vibrio*

*cholerae* sin detrimento de sus propiedades colonizadoras, con el objetivo de distinguir inequívocamente el mismo de otros aislados ambientales. La colonización del intestino delgado humano por el *Vibrio cholerae* es un factor importante para inducir una respuesta inmune local de anticuerpos IgA en la mucosa intestinal. Dicha respuesta es necesaria para la defensa efectiva contra el agente etiológico del cólera en futuras exposiciones, así como para despertar una memoria inmunológica suficiente para lograr una protección duradera (Taylor y cols., The Journal of Infectious Diseases, 1994, 170: 1518-23).

El Doctor J. Mekalanos de la Universidad de Harvard ha planteado que la internalización de la bacteria *Vibrio cholerae* a través las placas de Peyer en el intestino es una consecuencia favorable del proceso de colonización, que no produce un síndrome clínico adverso y es un paso esencial en la producción de una respuesta inmune local. Por el contrario, la interacción del microorganismo con los enterocitos, las células más abundantes en la superficie del epitelio del intestino, genera efectos adversos en el organismo humano (Mekalanos J. y cols. Bull Inst, Pasteur, 93: 255-262, 1995). Por tanto, la interacción con las placas de Peyer es una propiedad deseada en una vacuna viva anti-cólera, pero la interacción con los enterocitos es indeseada.

#### Descripción de la invención.

La presente invención describe un método para obtener una cepa inocua, genéticamente definida y estable de *Vibrio cholerae*, la cual es útil como vacuna viva para inducir protección inmunológica contra el cólera en humanos al ser suministrada oralmente. Dicha cepa deriva de un mutante no toxigénico de *Vibrio cholerae* y la inocuidad es obtenida inactivando el gen de la hemaglutinina proteasa (*hap*) mediante la inserción del gen marcador *ce/A* en su secuencia codificadora. En inclusiones preferidas de este documento la cepa vacunal pertenece a cualquiera de los dos serotipos comprendidos en el biotipo El Tor de *Vibrio cholerae* o al serogrupo O139. Preferiblemente dicha cepa deriva de un mutante no toxigénico de *Vibrio cholerae* obtenido mediante técnicas de ingeniería genética y está marcada con la inserción del gen *ce/A* dentro del gen *hap*. De modo más preferible la cepa es 638, 1333, o L911.

La invención incluye adicionalmente un método para disminuir el impacto ambiental de cualquier cepa vacunal viva o de cualquier cepa base utilizada para la

producción de vacunas muertas. El método implica la clonación y la manipulación genética "in vitro" del gen *thyA* para delecionarle un fragmento interno y el posterior remplazamiento del gen natural del microorganismo en el cromosoma por una copia mutada.

5 Entre las inclusiones preferidas de esta invención resulta cualquier cepa vacunal de *Vibrio cholerae* de los biotipos y serotipos existentes o cualquier cepa no toxigénica de otro serotipo emergente que haya sido manipulada genéticamente para mutar el gen *hap* y el gen *thyA* y crear un doble mutante de reducido impacto ambiental para  
10 propósitos vacunales. De forma más preferible, el mutante es un derivado de 81, 413 o SG251a, y de la forma más preferible aún el mutante es 638T o los derivados *thyA*<sup>-</sup> de las cepas 1333 o L911. De igual forma esta versión inocua y contenida de cepas no toxigénicas es útil como un portador de antígenos heterólogos al sistema inmune de mucosas.

Se ha encontrado que las cepas anteriores han sido poco reactogénicas en  
15 ensayos de laboratorio y clínicos. También se ha demostrado su capacidad para despertar una fuerte respuesta inmune contra *Vibrio cholerae* luego de inoculación de voluntarios sanos por vía oral. Como resultado estos mutantes imposibilitados en su capacidad de expresar la hemaglutinina proteasa (HAP) así como la cepa derivada comparten las características de una vacuna oral contra el cólera en humanos.

20 En un aspecto adicional la invención ofrece DNA suficientemente puro codificador del gen *thyA*. Entiéndase por este DNA la secuencia mostrada en la lista de secuencias (SEQ ID NO: 1) y los fragmentos, delecciones, interrupciones y secuencias homólogas derivadas.

La construcción de las cepas vacunales descritas aquí involucra el intercambio  
25 del gen cromosómico salvaje que codifica la HAP por un alelo interrumpido por *ce/A* en mutantes no toxigénicos de *Vibrio cholerae* desprovistos de todos los genes comprendidos en el virus *ctxφ*. Estos mutantes están bien definidos genéticamente y son estables en el defecto de la actividad proteolítica producido por la inactivación de *hap*. Dichos mutantes son igualmente estables en la expresión de la actividad  
30 celulolítica conferida por el gen *ce/A* insertado en el cromosoma luego de pasar por el intestino de ratones lactantes o humanos.



La construcción de sus derivados caracterizados por un menor impacto ambiental, involucra la introducción de una delección genética en el gen *thyA* para obtener un mutante auxotrófico a la timidina. El triple mutante obtenido está bien definido genéticamente y es estable. La mutación en este confiere resistencia al antibiótico trimetoprima en presencia de timidina. Dicha resistencia es poco probable que se incorpore a otras cepas bacterianas por transferencia horizontal debido a su naturaleza recesiva.

La presente invención protege cepas no toxigénicas e inoñas, genéticamente definidas y estables que son útiles como vacunas vivas para inducir protección inmunológica por vía oral contra el cólera en humanos. Para el diseño de candidatos vacunales no reactogénicos o inoños nos hemos apoyado en la consideración de la reactogenicidad como un proceso inflamatorio resultante de la interacción de los vibriones del cólera con los enterocitos. Razonamos que la inactivación de la proteasa soluble mayoritaria, responsable de la degradación de la mucina, en una cepa de vibrio desprovista de los genes de la toxina, produciría una cepa derivada que penetraría ineficientemente la gruesa capa de mucina que cubre los enterocitos, pero que todavía sería capaz de penetrar la fina capa que cubre la célula M y llegar hasta ella para inducir una fuerte respuesta inmune. La hemaglutinina/proteasa fue la proteasa mayoritaria con actividad digestiva sobre la mucina encontrada en C7258, C6706 y SG25-1. Con el objetivo de inactivar la hemaglutinina proteasa el gen *celA* se introdujo en el gen *hap* del cromosoma de *Vibrio cholerae*. Esta mutación combinada con la delección de los genes acompañantes del fago *ctx* permitió obtener candidatos vacunales marcados con excelentes propiedades para la vacunación de los humanos contra la enfermedad.

Como ejemplo, más que con el interés de limitarnos, en la tabla 1a describimos los mutantes no toxigénicos de *V. cholerae* útiles para construir derivados inoños desprovistos de hemaglutinina/proteasa con el propósito de utilizarse como vacunas. Los mutantes no toxigénicos están caracterizados específicamente por la ausencia de todas las secuencias codificadoras del fago *ctx* en el cromosoma y por la presencia de una sola copia del elemento RS1, cuya secuencia nucleotídica ha sido verificada por secuenciación de DNA. Los métodos empleados en la obtención de los mutantes no

toxigénicos están bien descritos en otro lugar. (Archives of Medical Research, 27. No. 3, pp 275-283).

Tabla 1a. Cepas no toxigénicas útiles para la construcción de cepas inocuas, afectadas en la expresión de HA/P.

| Candidato vacunal | Biotipo/Serotipo | Genotipo               |
|-------------------|------------------|------------------------|
| 81                | El Tor/Ogawa     | $\Delta\text{ctx}\phi$ |
| 413               | El Tor/Inaba     | $\Delta\text{ctx}\phi$ |
| SG25-1a           | O139             | $\Delta\text{ctx}\phi$ |

Todas las cepas y los métodos de hacerlas aparecen descritos en Archives of Medical Research, Vol. 27, No. 3, pp. 275-283, 1996. 81 y 413 derivan de C7258 y C6706, respectivamente; siendo aislamientos clínicos de Perú, 1991. SG25-1a es un derivado O139 del aislado SG25-1, de Calcutta, La India, 1993.

De manera similar en la tabla 1b aparecen las cepas defectuosas en la expresión de la hemaglutinina/proteasa útiles para construir derivados afectados en la expresión de *thyA* que poseen mejores atributos de bioseguridad.

Tabla 1b. Cepas afectadas en la expresión de HA/P, útiles en la construcción de mutantes *thyA*.

| Candidato vacunal | Propiedades relevantes   |
|-------------------|--------------------------|
| 638               | 81 hap:: <i>celA</i>     |
| 1333              | 413 hap:: <i>celA</i>    |
| L911              | SG251a hap:: <i>celA</i> |

Caracterización de las cepas inocuas y de un derivado obtenido mediante mutación en el gen *thyA*.

Caracterización serológica.

Luego de la introducción de cada mutación en las cepas vacunales descritas en este documento, cada derivado fue chequeado para la expresión correcta del lipopolisacárido correspondiente al serotipo de partida. Para ello las células fueron recogidas de una placa fresca, resuspendidas en salina (NaCl, 0.9%) e inmediatamente

examinadas con un suero de aglutinación de la firma Difco, específico para el serotipaje de vibrios Ogawa, Inaba u O139.

La respuesta inmune mayoritaria en los vacunados es contra el LPS. La expresión del antígeno correspondiente a cada una de las cepas presentadas en esta invención fue confirmada por la aglutinación con los antisueros específicos. Por otra parte el patrón electroforético de los LPS en geles de poliacrilamida y análisis de Western blot se mantuvo inalterado.

#### Ensayo de colonización del ratón lactante.

El ensayo de colonización del ratón lactante (Herrington y cols., J. Exper. Med. 168: 1487-1492, 1988) fue utilizado para conocer las propiedades colonizadoras de cada cepa. Un inóculo de  $10^5$  -  $10^6$  vibrios en un volumen final de 50  $\mu$ l fue suministrado por inoculación orogástrica a grupos de al menos 5 ratones lactantes. Luego de 18-24 horas de incubación a 30°C los ratones fueron sacrificados, el intestino fue disectado, homogenizado y diluciones apropiadas fueron plaqueadas en medio bacteriológico con los suplementos necesarios para el crecimiento de los mutantes.

En la tabla 2 puede observarse la capacidad colonizadora de las cepas vacunales descritas en esta invención. Excepto la L911, el resto de las cepas son buenas colonizadoras del tracto gastrointestinal de ratones lactantes. Es bien conocida la correlación existente entre la colonización del intestino de este modelo animal y la del intestino humano por cepas de *Vibrio cholera*.

El mutante 638T, es dependiente de timidina para su crecimiento. Esta mutación invalida a esta cepa para su multiplicación en el medio ambiente, donde la fuente de pirimidinas es escasa, si existe alguna.

Tabla 2. Capacidad colonizadora de las cepas vacunales.

| Cepa | Inóculo           | Colonizando       | Biotipo/Serotipo | Genotipo relevante.                       |
|------|-------------------|-------------------|------------------|---|
| 638  | $1 \times 10^6$   | $2.8 \times 10^5$ | El Tor/Ogawa     | $\Delta ctx\phi, hap::cel/\Delta$         |
| 1333 | $2 \times 10^6$   | $4.2 \times 10^5$ | El Tor/Inaba     | $\Delta ctx\phi, hap::cel/\Delta$         |
| L911 | $1.2 \times 10^5$ | $8 \times 10^3$   | O139             | $\Delta ctx\phi, hap::cel/\Delta$         |
| 638T | $1.7 \times 10^6$ | $6 \times 10^5$   | El Tor/Ogawa     | $\Delta ctx\phi, hap::cel/\Delta, thyA^-$ |

### Detección de la actividad proteasa.

Placas de LB suplementadas con leche al 1,5 % fueron utilizadas para detectar la actividad proteolítica existente en el sobrenadante de vibrios cultivados en TSB. Alternativamente, la cuantificación se realizó utilizando como sustrato azocaseína. Para  
5 ello, un volumen de 200 µl de sobrenadante de cultivo fue mezclado con 1.1 ml de buffer de reacción (CaCl<sub>2</sub>, 1mM; Tris, 0.2 M pH 7.2; Azocaseína 1%) e incubado durante 1 hora a 37°C. El sustrato no transformado fue precipitado con 83 µl de ácido tricloroacético al 40% durante 10 minutos, seguido de centrifugación durante 10 minutos adicionales a 12 000 rpm. El producto de reacción, que es coloreado y  
10 permanece en solución, fue neutralizado con NaOH y leído a 450 nm. Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que incrementa la densidad óptica neta de la muestra en uno durante una hora de reacción. Los candidatos vacunales defectivos de la expresión de la HA/P desarrollados aquí, presentan una reducción en su actividad proteolítica equivalente al 60-80% del total  
15 que exhiben sus parentales no toxigénicos.

### Detección de los vibrios expresando el marcador endoglucanasa A.

Para detectar la actividad de la endoglucanasa A, los vibrios fueron crecidos en placas de LB durante 24 horas, cubiertos por una pequeña capa de agar indicador-CMC, e incubados durante 3 horas a 60°C. Las colonias positivas para la expresión de  
20 la endoglucanasa A aparecen como colonias rojas con un halo transparente sobre un fondo rojo, luego de la tinción con Rojo Congo. El agar indicador-CMC se compone de 0.7% agarosa, 0.5% de CM-celulosa en buffer fosfato-citrato a pH 6.3 y la solución de tinción fue 1% de Rojo Congo en agua. Como resultado de este ensayo se obtiene que el marcador *celA* se expresa establemente, no es tóxico en cepas de *Vibrio cholerae* y  
25 permite distinguir las cepas vacunales de otros vibrios (figura 1).

### Análisis de la auxotrofía a timidina en cepas vacunales generadas por mutagénesis supresora dirigida al gen *thyA*.

Se utilizó medio mínimo suplementado con glucosa, como única fuente de carbono, y timidina (200 µg/ml) para crecer los mutantes afectados en la expresión de  
30 timidilato sintasa imposibilitados de crecer en medio mínimo. Placas de LB suplementadas con timidina (200 µg/ml) fueron utilizadas para chequear la resistencia a trimetoprima de las cepas con mutaciones en el gen *thyA*. La estabilidad de la

auxotrofía a timidina fue analizada mediante replicación de colonias desde placas de M9-glucosa-timidina hacia M9-glucosa.

Todas las cepas contenidas en esta invención son prototróficas con excepción de la 638T, cuya propiedad se reivindica además, que depende de la timidina o timina para el crecimiento. Cuando la cepa 638T es suplementada con uno de estos compuestos manifiesta la propiedad de resistencia a trimetoprima (200 µg/ml) que le confiere la mutación introducida en el gen *thyA*.

#### Ensayo de motilidad.

Las células de una colonia bien aislada se cargan en la punta de una asa de platino desde una placa maestra hacia una placa para detección de la motilidad (LB, agar 0.4%), introduciendo la punta del asa 2-3 mm en el agar. El diámetro de dispersión de cada colonia en el agar suave se mide a las 24 horas de incubación a 30°C. El criterio de motilidad se toma como sigue. Una cepa bacteriana que alcance un diámetro de 3 mm o menos desde el punto de inoculación es considerada no mótil. Una cepa bacteriana que se dispersa en un diámetro mayor de 3 mm es considerada mótil.

Todas las cepas contenidas en esta invención resultaron ser móviles, con la excepción de la L911, según los resultados obtenidos en agar suave.

#### Ensayo para detección del flagelo.

Las cepas móviles o no móviles fueron ensayadas para la presencia de flagelo mediante microscopía electrónica. Para ello, los vibrios fueron crecidos durante 4 horas a 37°C en agar para expresión de factores de colonización (agar CFA, Casaminoácidos, 1 %; Extracto de levadura, 0.15%; Sulfato de Magnesio, 0.05%; Cloruro de Manganeseo, 0.005%), resuspendidos y lavados en salina. Las bacterias fueron teñidas negativamente con acetato de uranilo (1%) durante 3 minutos y analizadas mediante microscopía electrónica de transmisión.

La presencia del flagelo bacteriano fue demostrada en todas las cepas vacunales, haciendo especial énfasis en la cepa no mótil L911 (figura 2).

#### Ensayo para el TCP

La presencia del pili corregulado con la toxina en las cepas vacunales obtenidas fue analizada por inmunomicroscopía electrónica. Las células fueron cultivadas igual que para el ensayo del flagelo. Suspensiones frescas de los vibrios (10 µl) fueron depositadas en una rejilla de nickel cubierta con carbón, fijadas durante 1 minuto

mediante exposición a una lámpara de 60 watts y el exceso de líquido eliminado sobre un papel de filtro. La rejilla fue invertida en una gota de suero específico para el TCP diluido en solución salina conteniendo 1% BSA y 0.05% tween-80; incubada durante 15 minutos, lavada con salina-BSA-Tween e incubada durante 15 minutos con el conjugado marcado con oro diluido en el mismo buffer. Luego de lavar las muestras tres veces en salina-BSA-tween, fueron teñidas durante 1 minuto con una solución al 1% de molibdato de amonio.

La expresión de pili corregulado con la toxina (TCP), fue visualizada en la superficie bacteriana de todas las cepas analizadas (638, 1333, L911 y 638T) mediante inmunomicroscopía electrónica (figura 3). Adicionalmente la expresión de este importante factor de colonización fue evaluado por Western blot.

Varias cepas de *Vibrio cholerae* pertenecientes a tres serotipos fueron utilizadas para insertar el gen *ce/A* en su cromosoma dirigido a interrumpir el gen de la hemaglutinina proteasa con el objetivo de disminuir sustancialmente la capacidad de la bacteria para degradar la mucina.

La ausencia de un gen *hap* funcional en cepas de *Vibrio* debe disminuir la reactogenicidad de las mismas por la causa expresada anteriormente, sin embargo el cumplimiento o no de esta hipótesis no impide el uso de las cepas 638, 1333, L911 y 638T como vacunas.

#### Cepas vacunales vivas.

Las cepas 638, 1333, L911 y 638T descritas aquí, pueden ser utilizadas para conferir una adecuada protección inmunológica contra el cólera en los humanos, ya que al ser administradas oralmente en voluntarios se obtuvo altos porcentos de seroconversión contra el LPS homólogo y las reacciones adversas fueron despreciables.

De acuerdo con la epidemiología relevante del lugar donde se utilizará la vacuna, pudiera emplearse una de las cepas anteriores o combinaciones de ellas.

#### Metodología de cultivo de las cepas vacunales

Las cepas vacunales fueron cultivadas en los medios tradicionales utilizados para el vibrio (LB). En el caso de los mutantes *thyA* el medio fue suplementado con timidina 50 µg/ml.

Dosis.

Las bacterias para inóculo son recolectadas en solución salina estéril a partir de una placa fresca y administradas a los voluntarios en una dosis de  $10^7$ - $10^9$  células en bicarbonato de sodio al 2%. Alternativamente algunos voluntarios pudieran recibir más de una dosis.

Evaluación clínica de 638.

La cepa 638 ha sido evaluada en ensayos en humanos que involucraron 42 voluntarios de entre 18 y 40 años. En la tabla 3 se muestra un resumen de los resultados clínicos obtenidos luego de la ingestión de la cepa 638 y el placebo. Todas las manifestaciones clínicas observadas fueron leves y de muy corta duración. En los datos presentados no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los grupos inoculados y el placebo. Las reacciones más frecuentes reportadas en los voluntarios independientemente de la dosis fueron meteorismos y cólicos abdominales. En cuatro voluntarios se presentaron diarreas leves, tres de estos voluntarios recibieron la máxima dosis y uno la dosis intermedia. Uno de los voluntarios que recibió la máxima dosis tuvo cinco deposiciones (72 horas después de la inoculación) para un total de 680 gramos. Dos voluntarios tuvieron dos deposiciones a las 28 y 72 horas después de inoculados para un total de 220 y 500 gramos respectivamente. El otro voluntario tuvo una diarrea de 300 gramos a las 72 horas de inoculado.

Aislamiento bacteriológico de la cepa vacunal.

Como se indica en la Tabla 4, la cepa 638 fue recuperada en 37 de los 42 voluntarios inoculados (88%). En el caso de la dosis más alta, la excreción de la cepa vacunal tendió a un pico a las 72 horas después de la inoculación. Tres de los cuatro casos de diarrea ocurrieron a ese tiempo. De los 37 voluntarios que excretaron vibrios, 12 excretaron por lo menos durante cuatro días, 19 por lo menos durante 3 días y 28 durante 2 días. El número de voluntarios que excretaron la cepa 638 y el valor medio de vibrios/g de heces disminuyeron en la dosis más baja.

Los vibrios aislados de las heces de los voluntarios producían endoglucanasa A indicando que el gen reportero *ce/A* era mantenido establemente durante el crecimiento en el intestino delgado humano.

Respuesta inmune contra la cepa vacunal.

La cepa 638 indujo una respuesta inmune de consistencia y significación en términos de anticuerpos vibriocidas en el suero, IgG ó IgA contra el LPS Ogawa y células productoras de anticuerpos IgA específicas para el LPS del biotipo Ogawa (tablas 5 y 6). A pesar de que el recíproco de la media geométrica de los títulos (1/G) tuvo un pico a los 14 días después de la inoculación, la seroconversión fue obtenida al día 7 y los títulos permanecieron altos hasta el día 28. Los grados de seroconversión, el pico de 1/G, y los títulos por ELISA fueron dependientes de la dosis. No obstante, aún para las dosis más pequeñas la cepa 638 alcanzó títulos de anticuerpos vibriocidas significativos comparados con el grupo placebo. Una proporción importante de voluntarios que experimentaron seroconversión desarrollaron títulos vibriocida relativamente altos,  $\geq 1024$ , (tabla 6). El alto porcentaje de respondedores en la evaluación de células productoras de anticuerpos (tabla 5) refleja una efectiva estimulación de la inmunidad mucosal, principalmente IgAs, por la cepa 638 en correspondencia con los elevados títulos de IgA anti-LPS encontrados a los 14 días después de la inoculación. Uno de los voluntarios que recibió el placebo cumple con el criterio de seroconversión pero se explica teniendo en cuenta los bajos niveles de IgG anti-LPS antes de la inoculación. Otro de los voluntarios de este grupo alcanzó el nivel umbral de células productoras de anticuerpos, lo cual es explicable por las mismas razones. Con estos resultados concluimos que la cepa 638 induce una respuesta inmune significativa en humanos.



Tabla 3. Frecuencia de aparición de reacciones adversas luego de la ingestión de la cepa vacunal 638 El Tor Ogawa.

| Ingestión de la cepa vacunal 638 El Tor Ogawa.                     |                        |    |                      |    |                   |                 |                |
|--|------------------------|----|----------------------|----|-------------------|-----------------|----------------|
| Síntomas   | Grupo de voluntarios   |    |                      |    | R.R. <sup>3</sup> | IC <sup>4</sup> | Valor (Fisher) |
|  | Vacunados <sup>1</sup> |    | Placebo <sup>2</sup> |    |                   |                 |                |
|  | +                      | -  | +                    | -  |                   |                 |                |
| Diarreas   | 4                      | 38 | 1                    | 13 | 1.33              | 0.16 -10.96     | 0.6329         |
| Cólicos  | 13                     | 29 | 2                    | 12 | 2.17              | 0.56 -8.44      | 0.1944         |
| Meteorismo   | 14                     | 28 | 3                    | 11 | 1.56              | 0.52 -4.63      | 0.3143         |
| Acidez   | 6                      | 36 | 2                    | 12 | 1.00              | 0.23 -4.40      | 0.6850         |
| Cefalea  | 7                      | 35 | 0                    | 14 | -                 | -               | 0.1163         |
| Vómitos  | 1                      | 41 | 0                    | 14 | -                 | -               | 0.7500         |
| Voluntarios con diarrea  |                        |    |                      |    |                   |                 |                |
| Valor medio del peso de las heces (rango)                          |                        |    |                      |    | 425 g (220-680)   |                 |                |
| Valor medio del número de diarreas por voluntario afectado (rango) |                        |    |                      |    | 2 (1-5)           |                 |                |

Notas: <sup>1</sup>N = 42, <sup>2</sup>N = 14, <sup>3</sup>Riesgo Relativo, <sup>4</sup>Intervalo de confianza (95 %)

5. Tabla 4. Recobrado de *Vibrio cholerae*, cepa 638 de las heces de los voluntarios.

| Tabla 4. Recobrado de <i>Vibrio cholerae</i> , cepa 655 de las heces |  |       |       |       |       |       |                       |
|--|--|-------|-------|-------|-------|-------|-----------------------|
| Grupo de voluntarios   | Voluntarios que excretaron la cepa/total |       |       |       |       | Total | Media UI-C/g heces    |
|  | Tiempo después de la inoculación (h)     |       |       |       |       |       |                       |
|  | 24                                       | 48    | 72    | 96    | 120   |       |                       |
| Dosis alta<br>(1-2 x 10 <sup>9</sup> )                               | 7/29                                     | 10/29 | 16/29 | 15/29 | 10/29 | 28/29 | 4.4 x 10 <sup>6</sup> |
| Dosis media<br>(2 x 10 <sup>8</sup> )                                | 6/6                                      | 5/6   | 4/6   | 4/6   | 3/6   | 6/6   | 5.5 x 10 <sup>6</sup> |
| Dosis baja<br>(4 x 10 <sup>7</sup> )                                 | 1/7                                      | 2/7   | 2/7   | 2/7   | 2/7   | 3/7   | 2.7 x 10 <sup>5</sup> |

Tabla 5. Respuesta de células productoras de anticuerpos IgA contra el LPS en sangre del sistema periférico luego de la inoculación con 638.

| Dosis   | Positivos (%) | Media de CPA en 10 <sup>7</sup> Mononucleares (rango) |
|---------|---------------|---|
| Alta    | 27/29 (93.1)  | 485 (0-4750)  |
| Media   | 6/6 (100)     | 377 (40-1285)   |
| Baja    | 6/7 (85.7)    | 371 (0-2040)  |
| Placebo | 1/14 (7.1)    | 5 (0-65)  |

Tabla 6. Respuesta de anticuerpos en suero de voluntarios inoculados oralmente con la cepa 638 El Tor Ogawa.

| Respuesta   | Grupo de voluntarios |                 |                 |                 |
|---|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|   | Dosis alta           | Dosis media     | Dosis Baja      | Placebo         |
| Anticuerpos vibriocida                                    |                      |                 |                 |                 |
| Porcentaje de Seroconversión <sup>1</sup> (%)             | 24/29 (82)           | 5/6 (83)        | 5/7 (71)        | 0/14 (0)        |
| GMT (rango):  |                      |                 |                 |                 |
| Pre-inoculación   | 47 (0-160)           | 32 (0-40)       | 33 (0-40)       | 37 (0-320)      |
| Post-inoculación  | 873                  | 639             | 389             | 46              |
| pico (14 days)  | (0-20480)            | (0-2560)        | (40-2560)       | (0-320)         |
| Positivos con títulos $\geq 1024$                         | 10/24                | 4/5             | 4/5             | 0               |
| IgG contra el LPS Ogawa                                   |                      |                 |                 |                 |
| Porcentaje de seroconversión <sup>2</sup> (%)             | 23/29 (79)           | 4/6 (67)        | 3/7 (44)        | 1/14 (7)        |
| Logaritmo del recíproco del título <sup>3</sup> $\pm$ SD: |                      |                 |                 |                 |
| Pre-inoculación   | 0.12 $\pm$ 0.25      | 0.12 $\pm$ 0.29 | 0               | 0.03 $\pm$ 0.12 |
| Post-inoculación  | 1.86 $\pm$ 1.12      | 1.59 $\pm$ 1.49 | 1.07 $\pm$ 1.36 | 0.19 $\pm$ 0.57 |
| Pico (14 days)  |                      |                 |                 |                 |
| IgA contra el LPS Ogawa                                   |                      |                 |                 |                 |
| Seroconversión <sup>2</sup> (%)                           | 26/29 (90)           | 6/6 (100)       | 5/7 (71)        | 0/14 (0)        |
| Logaritmo del recíproco del título <sup>3</sup> $\pm$ SD: |                      |                 |                 |                 |
| Pre-inoculación   | 0.1 $\pm$ 0.37       | 0               | 0.27 $\pm$ 0.37 | 0.13 $\pm$ 0.39 |
| Post-inoculación  | 2.43 $\pm$ 1.0       | 2.68 $\pm$ 0.48 | 1.96 $\pm$ 1.25 | 0.19 $\pm$ 0.53 |
| pico (14 días)  |                      |                 |                 |                 |

Notas: <sup>1</sup>Número de voluntarios con aumento de 4 veces en el título/total,

<sup>2</sup>Número de voluntarios con incremento de dos veces en el título/total,

<sup>3</sup>Logaritmo del recíproco del título. Abreviaciones: GMT, Media geométrica del título; SD, desviación estándar de la media.

#### IV Ejemplos.

Los ejemplos que mostraremos aquí tienen el objetivo de ilustrar la invención y no deben limitar la esencia de la misma.

5 Ejemplo 1. Construcción de cepas inocuas a partir de cepas no toxigénicas.

Para construir una cepa afectada en la expresión de HA/P a partir de las cepas no toxigénicas descritas en la tabla 1a, cada cepa de partida fue manipulada de igual modo. Primero, el vector suicida pGPH6 (figura 4), conteniendo el gen *hap* inactivado por la inserción del gen reportero *ce/A* fue transferido de *E. coli* SM10λpir hacia la cepa no toxigénica de partida para producir un cointegrado resistente a ampicillina. Segundo, una hibridación de Southern demostró que el cointegrado contenía el gen *hap* inactivado por inserción de *ce/A* separado de su alelo natural por DNA del vector. Tercero, el cointegrado anterior, resistente a ampicillina fue cultivado en ausencia de presión selectiva del antibiótico, condición que permite la segregación del mismo. Las colonias sensibles a ampicillina designadas 638, 1333 y L911 fueron caracterizadas por análisis de Southern, demostrando que contienen el gen mutado *hap::ce/A*.

Ejemplo 2: Creación del mutante 638T defectivo en el gen *thyA* de *Vibrio cholerae* por mutagénesis *in vitro*.

20 Para construir mutantes de *Vibrio cholerae* afectados en la expresión de la timidilato sintasa, el gen *thyA* fue primero clonado y secuenciado. El gen *thyA* de *Vibrio cholerae* fue clonado por complementación de un mutante espontáneo de la cepa 81 resistente a trimetoprima y dependiente de timidina (mutante 815).

La complementación se realizó utilizando una genoteca de la cepa C7258 construida en el plásmido pBR322. Se escogió un clon plasmídico, se purificó y el inserto contenido se subclonó en pUC19, el cual sirvió de molde para facilitar la secuenciación con el uso de oligonucleótidos universales. La secuencia nucleotídica del gen *thyA* y la secuencia polipeptídica predicha para la proteína timidilato sintasa (TSasa) se muestran en la lista de secuencias (SEQ ID NO: 1).

30 Para construir la cepa vacunal defectiva en Timidilato Sintasa se delecionó *in vitro* un fragmento de restricción interno del marco abierto de lectura del gen *thyA*. La delección comprende los nucleótidos entre los sitios de restricción *Bgl*III y *Mlu*I y elimina

el fragmento de ADN que codifica para los aminoácidos desde el 7 al 105 de la proteína TSasa. La construcción genética resultante está incapacitada para complementar el defecto en Timidilato Sintasa del mutante espontáneo 815 de *Vibrio cholerae*. Este fragmento fue clonado en el sitio SacI del plásmido pCVD442 para obtener el plásmido pEST (figura 5), cuya replicación depende de la proteína  $\pi$  del fago Lambda-pir. *Vibrio cholerae* no es un hospedero permisivo para la replicación  $\pi$  dependiente del pEST, dado que no expresa de forma natural dicha proteína. Consecuentemente, cuando este plásmido es utilizado para transformar una cepa de *Vibrio cholerae*, la frecuencia de transformación es baja y los transformantes que se obtienen resultan de su integración al cromosoma bacteriano que hace su replicación dependiente de la replicación cromosómica. Una característica adicional de dicho plásmido es la presencia del gen *sacB*, cuya expresión es tóxica para *Vibrio cholerae* en presencia de sacarosa. El pEST fue utilizado para construir la cepa 638T y será útil para construir las cepas 1333T y L911T u otra adicional defectiva en *thyA* derivada de cualquier cepa de *Vibrio cholerae*. Con ese objetivo, el pEST fue transferido de *E. coli* SM10 $\lambda$ pir hacia *Vibrio cholerae* 638, para luego seleccionar un cointegrado resistente a la ampicilina. Mediante análisis de Southern se demostró que el cointegrado había sido originado por integración del plásmido en el gen *thyA*. Dicho cointegrado fue crecido en un medio libre de antibiótico y suplementado con timidina (50  $\mu$ g/ml) para permitir su resolución. Las colonias resistentes a sacarosa obtenidas a partir del cultivo anterior fueron seleccionadas en LB agar suplementado con sacarosa y timidina. Una colonia con requerimiento de timidina y sensible a la ampicilina fue designada 638T y caracterizada por Southern demostrándose que la cepa retuvo el alelo mutado del gen *thyA*.

A continuación sigue una descripción de las figuras:

Figura 1. Detección de Vibrios marcados con el gen *ceiA* mediante un ensayo en placa empleando agar indicador con celulosa carbóximetilada.

Figura 2. Detección del flagelo en la cepa L911.

Figura 3. Detección del TCP en la superficie bacteriana del mutante 638T.

Figura 4. Esquema representando la estructura del vector suicida pGPH6, empleado para construir cepas vacunales con la mutación *hap::ceiA*.

Figura 5. Estructura genética del plásmido pEST.

### Ventajas

La presente invención nos provee con un método para crear mutantes inocuos de *Vibrio cholerae*, útiles como vacunas, mediante la inactivación del gen de la hemaglutinina/proteasa en mutantes no toxigénicos.

5 Las características de inmunogenicidad e inocuidad de las cepas 638, 1333 y L911 son similares a las de las presentadas en WO 95/18633. Adicionalmente dichas cepas poseen un marcador que las distingue y son representativas de cada uno de los biotipos y serotipos que circulan en la pandemia actual así como del nuevo serogrupo O139. Las mutaciones empleadas para construir las cepas descritas en esta invención  
10 están bien definidas, ya sea por delección de fragmentos de restricción o por inserción de genes heterólogos.

Esta invención también provee un método para mejorar la bioseguridad ambiental de las vacunas vivas de cólera que son utilizadas por vía oral. Dicho mejoramiento se obtiene introduciéndoles una mutación que inhabilita el gen  
15 codificador de la Timidilato Sintasa.

Las cepa vacunal 638T mejorada en sus atributo de bioseguridad ambiental, descrita en la invención tienen requerimientos de timina o timidina para su crecimiento, lo que limita su proliferación el medio ambiente donde la fuente de pirimidinas libres es escasa, si existiera.

20 La resistencia a trimetoprima generada por la mutación del gen *thyA* tiene carácter recesivo y su transmisión a otras bacterias por mecanismos de transferencia horizontal no tiene efecto. Adicionalmente la expresión de la resistencia a trimetoprima requiere de la presencia de timidina o timina, compuestos escasos de forma libre en la naturaleza.

25 En estos mutantes la readquisición de los genes tóxicos y otros mecanismos de transferencia horizontal de la información es superflua y podrán ser usados sin las actuales preocupaciones referentes a su bioseguridad.

### V. Depósitos

Los datos de los números de colección están pendientes.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para obtener a partir de una cepa no toxigénica de *Vibrio cholerae* un derivado inocuo para inmunizar contra el cólera, caracterizado por la inactivación del gen de la hemaglutinina proteasa, bien sea por delección, por inserción u otra manipulación genética definida e irreversible.
2. Una cepa vacunal de *Vibrio cholerae*, obtenida a partir de un mutante no toxigénico de *Vibrio cholerae*, caracterizada por tener inactivado el gen de la hemaglutinina proteasa, sea bien por delección, inserción u otra manipulación genética definida e  
10 irreversible.
3. Una cepa vacunal de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizada por pertenecer al biotipo Clásico.
4. Una cepa vacunal de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizada por pertenecer  
15 al biotipo El Tor.
5. Una cepa vacunal de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizada por pertenecer a los serotipos Inaba u Ogawa dentro del biotipo El Tor.
6. Una cepa vacunal de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizada por pertenecer al serogrupo O139.
- 20 7. Una cepa vacunal de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizada por pertenecer a cualquier serogrupo emergente contra el cual la vacunación actual sea inefectiva.
8. Una cepa vacunal de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizada porque la cepa inocua resultante es 638, 1333 o L911 de *Vibrio cholerae*.
9. Un método para obtener derivados bioseguros a partir de cepas vacunales inocuas de *Vibrio cholerae*, caracterizado por comprender la introducción de una mutación  
25 supresora definida e irreversible en el gen codificador de la timidilato sintasa.
10. Una cepa vacunal de *Vibrio cholerae* derivada de una cepa vacunal inocua, caracterizada por tener inactivado el gen codificador de la timidilato sintasa, sea por inserción, delección u otra manipulación genética definida e irreversible.
- 30 11. Una cepa vacunal de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizada por pertenecer al biotipo Clásico.

13. Una cepa vacunal de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizada por pertenecer a los serotipos Inaba u Ogawa dentro del biotipo El Tor.
14. Una cepa vacunal de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizada por pertenecer al serogrupo O139.
- 5 15. Una cepa vacunal de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizada por pertenecer a cualquier serogrupo emergente contra el cual la vacunación actual sea inefectiva.
16. Una cepa vacunal de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizada porque la cepa vacunal resultante es 638T, o un derivado de 1333 o L911 de *Vibrio cholerae*.
- 10 17. Una cepa vacunal de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizada por ser utilizada como base para la producción de una vacuna muerta.
18. El ADN puro, caracterizado por comprender la secuencia nucleotídica codificadora del gen natural *thyA* de *Vibrio cholerae* mostrada en la lista de secuencias (SEQ ID NO: 1), útil para obtener mutantes mejorados en sus atributos de bioseguridad ambiental.
- 15 19. El ADN de acuerdo con la reivindicación 18, caracterizado porque su secuencia nucleotídica comprenda una delección, disrupción o cualquier otra manipulación genética definida de dicho ADN que inactive la función del gen.
20. El ADN de acuerdo con la reivindicación 18 o su variante reivindicada en 19, caracterizado por estar contenido en una célula.
- 20 21. El ADN de acuerdo con las reivindicaciones 18, 19, o 20, caracterizado por estar contenido en un plásmido.

25

30

35

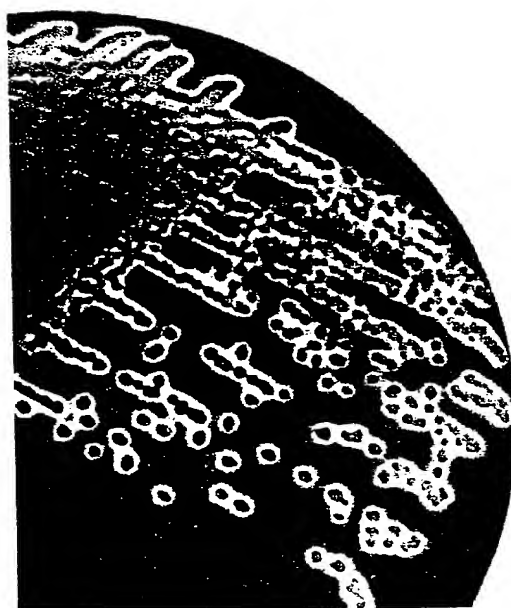


Figura 1.





Figura 2.

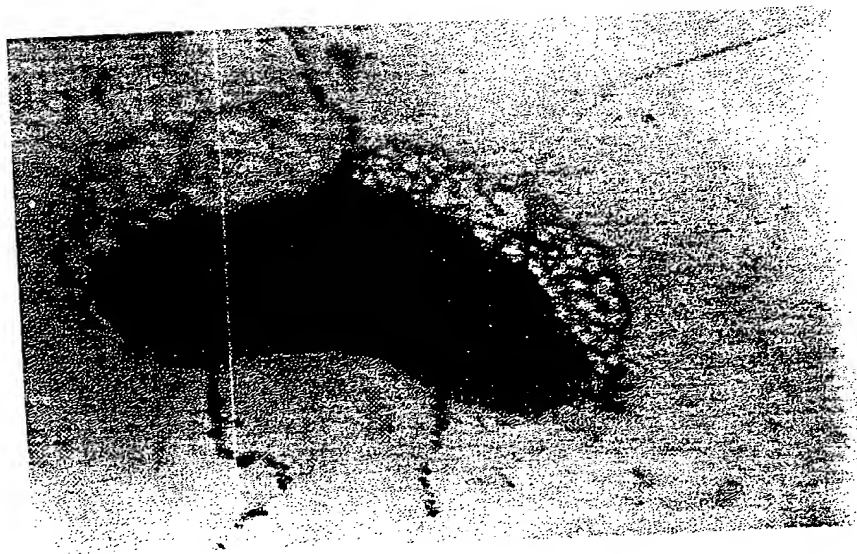


Figura 3.

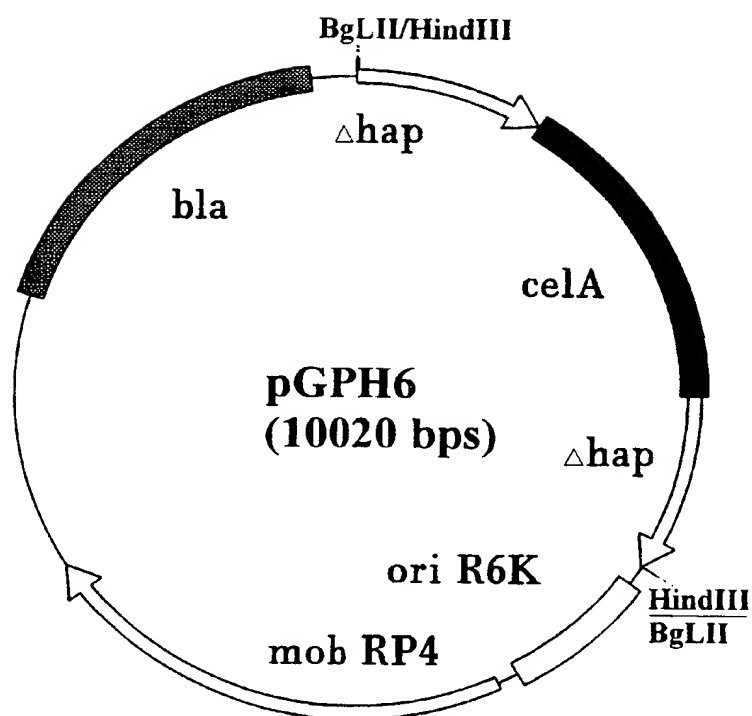


Figura 4.

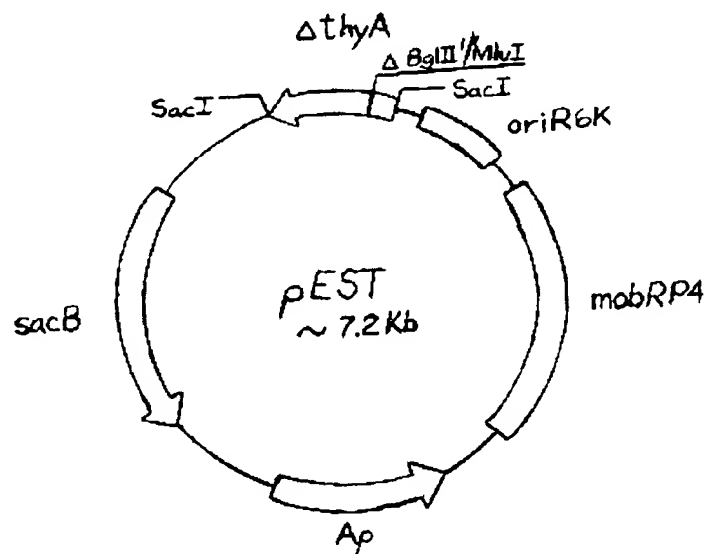


Figura 5.

## LISTA DE SECUENCIAS

## INFORMACION GENERAL

## SOLICITANTE

5 NOMBRE: Centro Nacional de Investigaciones Científicas.

CALLE: Avenida 25, esquina a 158.

CIUDAD: Ciudad de La Habana.

PROVINCIA: Ciudad de La Habana.

PAIS: Cuba.

10 CODIGO POSTAL: 12 100.

TELEFONO: 218066, extensión 248.

FACSIMIL: 537 330497

CORREO ELECTRONICO: "Rafael Fando"

<Fando@biocnic.cneuro.edu.cu>

15

TITULO: Nuevos candidatos vacunales de *vibrio cholerae* y métodos de obtención.

NUMERO DE SECUENCIAS: 1

20

## DIRECCION PARA CORRESPONDENCIA

DESTINATARIO: Consultores de Marcas y Patentes "CLAIMS".

CALLE: 14 #308 e/ 3ra y 5ta Ave. Miramar, Playa.

CIUDAD: Ciudad Habana.

25

PROVINCIA: Ciudad de La Habana.

PAIS: Cuba.

CODIGO POSTAL: 11 300.

## DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL

30

NUMERO DE SOLICITUD: 142/97

FECHA DE PRESENTACION: 30 de Diciembre de 1997.

## INFORMACION SOBRE EL ABOGADO AGENTE

NOMBRE: María Lourdes Ruiz Sotolongo.

NUMERO DE REGISTRO: 5

5

## INFORMACION CONCERNIENTE A LA SEQ. ID. NO: 1

## CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 852 nucleótidos.

TIPO: Acido nucleico.

10

NUMERO DE HEBRAS: Sencilla.

CONFIGURACION: lineal.

TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

15

## FUENTE DE ORIGEN:

ORGANISMO: *Vibrio cholerae*.

CEPA: C7258

## CARACTERISTICA:

20

NOMBRE: Secuencia codificadora del gen *thyA*.

LOCALIZACION: 1-852

## CARACTERISTICA:

25

NOMBRE: Péptido completo de la timidilato sintasa codificado por el gen *thyA*.

LOCALIZACION: 1-284.

30

## DESCRIPCION DE LA SECUENCIA : SEQ ID NO: 1

|   |     |
|---|-----|
| GTG AGA CAG TAT TTA GAT CTT TGT CAG CGC ATC GTC GAT CAA GGT | 45  |
| M R Q Y L D L C Q R I V D Q G                               |     |
| 1 5 10 15   |     |
| GTT TGG GTT GAA AAT GAA CGA ACG GGC AAG CGT TGT TTG ACT GTG | 90  |
| V W V E N E R T G K R C L T V                               |     |
| 20 25 30  |     |
| ATT AAT GCC GAT TTG ACC TAC GAT GTG GGC AAC AAT CAG TTT CCT | 135 |
| I N A D L T Y D V G N N Q F P                               |     |
| 35 40 45  |     |
| CTA GTC ACT ACA CGC AAG AGT TTT TGG AAA GCC GCC GTG GCC GAG | 180 |
| L V T T R K S F W K A A V A E                               |     |
| 50 55 60  |     |
| TTG CTC GGC TAT ATT CGT GGT TAC GAT AAT GCG GCG GAT TTT CGC | 225 |
| L L G Y I R G Y D N A A D F R                               |     |
| 65 70 75  |     |
| CAA TTA GGT ACC AAA ACC TGG GAT GCT AAT GCC AAT TTA AAC CAA | 270 |
| Q L G T K T W D A N A N L N Q                               |     |
| 80 85 90  |     |
| GCA TGG CTC AAC AAT CCT TAC CGT AAA GGT GAG GAT GAC ATG GGA | 315 |
| A W L N N P Y R K G E D D M G                               |     |
| 95 100 105  |     |
| CGC GTG TAT GGA GTT CAG GGT AGA GCT TGG GCT AAG CCT GAT GGT | 360 |
| R V Y G V Q G R A W A K P D G                               |     |
| 110 115 120   |     |
| GGT CAT ATT GAC CAG TTG AAA AAG ATT GTT GAT GAT TTG AGC CGT | 405 |
| G H I D Q L K K I V D D L S R                               |     |
| 125 130 135   |     |
| GGC GTT GAT GAC CGA GGT GAA ATT CTT AAC TTC TAC AAT CCG GGT | 450 |
| G V D D R G E I L N F Y N P G                               |     |
| 140 145 150   |     |
| GAA TTT CAC ATG GGG TGT TTG CGC CCT TGC ATG TAC AGC CAT CAT | 495 |
| E F H M G C L R P C M Y S H H                               |     |
| 155 160 165   |     |
| TTT TCA TTG CTG GGT GAT ACC TTG TAT CTC AAC AGT ACT CAG CGT | 540 |
| F S L L G D T L Y L N S T Q R                               |     |
| 170 175 180   |     |
| TCA TGT GAT GTG CCC TTG GGG TTG AAT TTC AAC ATG GTG CAG GTT | 585 |
| S C D V P L G L N F N M V Q V                               |     |
| 185 190 195   |     |
| TAT GTG TTC CTT GCG CTG ATG GCA CAG ATC ACA GGG AAA AAG CCG | 630 |
| Y V F L A L M A Q I T G K K P                               |     |
| 200 205 210   |     |
| GGC TTG GCG TAT CAC AAG ATC GTC AAT GCG CAC ATT TAC CAA GAT | 675 |
| G L A Y H K I V N A H I Y Q D                               |     |
| 215 220 225   |     |
| CAA CTC GAA TTG ATG CGC GAT GTG CAG CTA AAA CGT GAG CCA TTC | 720 |
| Q L E L M R D V Q L K R E P F                               |     |
| 230 235 240   |     |
| CCA GCG CCT CAG TTC CAT ATC AAT CCA AAG ATT AAA ACA CTG CAG | 765 |
| P A P Q F H I N P K I K T L Q                               |     |
| 245 250 255   |     |
| GAT TTG GAA ACT TGG GTC ACT TTG GAT GAT TTT GAC GTC ACC GGA | 810 |
| D L E T W V T L D D F D V T G                               |     |
| 260 265 270   |     |
| TAT CAG TTC CAC GAT CCT ATT CAA TAC CCG TTT TCA GTC TAA     | 852 |
| Y Q F H D P I Q Y P F S V -                                 |     |
| 275 280   |     |

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)